

Cover: to USP 5,763,191

D2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

特許第3071823号

(P3071823)

(45) 発行日 平成12年7月31日(2000.7.31)

(24) 登録日 平成12年5月26日(2000.5.26)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

G 0 1 N 33/547

G 0 1 N 33/547

33/53

33/53

U

33/543

5 9 5

33/543

5 9 5

請求項の数24(全 20 頁)

(21) 出願番号 特願平4-502451

(86) (22) 出願日 平成3年12月12日(1991.12.12)

(65) 公表番号 特表平5-502515

(43) 公表日 平成5年4月28日(1993.4.28)

(86) 国際出願番号 P C T / E P 9 1 / 0 2 3 9 3

(87) 国際公開番号 W O 9 2 / 1 0 7 5 7

(87) 国際公開日 平成4年6月25日(1992.6.25)

審査請求日 平成4年8月11日(1992.8.11)

審判番号 平8-8162

審判請求日 平成8年5月27日(1996.5.27)

(31) 優先権主張番号 P 4 0 3 9 6 7 7 . 0

(32) 優先日 平成2年12月12日(1990.12.12)

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(73) 特許権者 999999999

ベーリンガー マンハイム ゲーエムベ
ーハー

ドイツ連邦共和国 D-6800 マンハイ
ムーワールドホフ サンドホファー シュ
トラーセ 112-132

(72) 発明者 クノル, ヴォルフガング

ドイツ連邦共和国 D-6500 マイ
ツ, エルサーブランドストレームーシュ
トラーセ 18 デー

(74) 代理人 999999999

弁理士 平木 祐輔 (外2名)

合議体

審判長 後藤 千恵子

審判官 伊坪 公一

審判官 河原 英雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多目的バインディングフィルム

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】保持材と、該保持材上にアンカー部を有するフレキシブルスパーサー分子を介して吸着された、少なくとも一つのフリーの反応相手と結合する能力を有する固相反応物質とを含有するバインディングマトリックスであって、

前記フレキシブルスパーサー分子が2個または数個の前記固相反応物質と結合可能なものであり、前記固相反応物質が希薄な、横方向に均一な単分子層を前記保持材表面上に形成している前記バインディングマトリックス。

【請求項2】フレキシブルスパーサー分子がシスタミンから作られる、請求項1に記載のバインディングマトリックス。

【請求項3】保持材と、該保持材上にアンカー部を有するフレキシブルスパーサー分子を介して吸着された、少

10

2

なくとも一つのフリーの反応相手と結合する能力を有する固相反応物質とを含有するバインディングマトリックスであって、

親水性リンカー部が前記フレキシブルスパーサー分子と固相反応物質の間に存在し、前記固相反応物質が希薄な、横方向に均一な単分子層を前記保持材表面上に形成している前記バインディングマトリックス。

【請求項4】親水性リンカー部が1個又は数個のオキシエチレン基を含有する、請求項3に記載のバインディングマトリックス。

【請求項5】親水性リンカー部がアミノ末端またはヒドロキシ末端ポリエチレンオキシドによって構成される、請求項4に記載のバインディングマトリックス。

【請求項6】親水性リンカー部が1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンから作られる、請求項5に記載の

バインディングマトリックス。

【請求項7】保持材と、該保持材上にアンカー部を有するフレキシブルスベアー分子を介して吸着された、少なくとも一つのフリーの反応相手と結合する能力を有する固相反応物質と、前記フレキシブルスベアー分子とは別の、アンカー部を有するが固相反応物質とは結合していないフレキシブルスベアー分子とを含有するバインディングマトリックスであって、前記固相反応物質が希薄な、横方向に均一な単分子層を前記保持材表面上に形成している前記バインディングマトリックス。

【請求項8】固相反応物質が抗体と結合可能な抗原またはハプテンである、請求項1～7のいずれか1項に記載のバインディングマトリックス。

【請求項9】固相反応物質がビオチンである、請求項1～7のいずれか1項に記載のバインディングマトリックス。

【請求項10】保持材と、該保持材上にアンカー部を有するフレキシブルスベアー分子を介して吸着された、少なくとも一つのフリーの反応相手と結合する能力を有する固相反応物質とを含有するバインディングマトリックスであって、前記固相反応物質が内部成分、及び少なくとも1個のフリーの反応相手と結合することができる外部成分を含んでなり、前記内部成分は保持材表面に希釈されない層を形成し、前記外部成分はアフィニティー結合によって前記内部成分に結合して、希薄で横方向に均一な単分子層を前記保持材表面上に形成している前記バインディングマトリックス。

【請求項11】内部成分がビオチンであり、外部成分がストレプトアビジンである、請求項10に記載のバインディングマトリックス。

【請求項12】フレキシブルスベアー分子が式(CH_2)_n。(nは1から30までの自然数)を有するアルキレン基を少なくとも一個含有する、請求項1～11のいずれか1項に記載のバインディングマトリックス。

【請求項13】保持材表面の固相反応物質による被覆が、最大被覆の0.1から90%である、請求項1～12のいずれか1項に記載のバインディングマトリックス。

【請求項14】保持材表面の固相反応物質による被覆が、最大被覆の0.5から70%である、請求項13に記載のバインディングマトリックス。

【請求項15】保持材表面の固相反応物質による被覆が、最大被覆の1%から40%である、請求項14に記載のバインディングマトリックス。

【請求項16】保持材が、金属、金属酸化物またはガラス表面を有する、特許請求の範囲第1～15のいずれか1項に記載のバインディングマトリックス。

【請求項17】保持材が、金、銀、またはパラジウム表面を有し、アンカー部はチオール基、ジスルフィド基、

またはフォスフィン基である、請求項16に記載のバインディングマトリックス。

【請求項18】バイオアフィニティーを有する少なくとも2個の反応物質のうちの、一方が固相に結合して存在し、他の1または2個以上の反応相手はフリーであるような、そのような反応物質間の特異的結合反応によって、試料溶液中の分析対象物質を定量するための方法であって、固相に結合して存在する前記反応物質が請求項1～17のいずれか1項に記載されるバインディングマトリックスに組み込まれている状態の固相反応物質である前記方法。

【請求項19】特異的結合反応が、光学的に、電気的に、実熱量測定によって、または質量分析によって、定量される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】特異的結合反応が、光反射法によって定量される、請求項18に記載の方法。

【請求項21】特異的結合反応が、ブラズモン分光法によって定量される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】特異的結合反応が電位差測定または電流測定によって定量される、請求項18に記載の方法。

【請求項23】特異的結合反応が電気伝導度または静電容量の変化によって定量される、請求項18に記載の方法。

【請求項24】保持材に吸着して単分子層を形成する分子を含有する反応溶液とともに、保持材をインキュベートする、請求項1～17のいずれか1項に記載のバインディングマトリックスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、バインディングマトリックスに関する。本発明のバインディングマトリックスは、保持材、およびこれにアンカー部を介して吸着し、少なくとも一つのフリーの反応相手に対して結合能を有する、固相反応物質を含有するが、それによって、この固相反応物質は保持材の表面に希薄な単分子層を形成する。

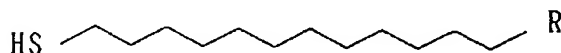
分子認識反応は、共有結合の形成なしに生じる二分子の安定かつ特異的な結合を伴う。実用上の目的のために、固体保持材と液体環境の境界面で進行する反応に、特に関心がもたれている。このために、固体保持材の表面を、固相反応物質を含有する固定化層で被覆する。その後実際の認識反応は、この固定化層上で進行する。

このような固定化層の例としては、重合アルブミンに結合したストレプトアビジンがあるが、さらにこのアルブミンは吸着によって容易にプラスチック表面に結合する。この固相物質は、ビオチンまたはビオチニル化した反応物質と結合させることによって、多数の免疫学的検査に利用できる。このようなストレプトアビジン/ポリアルブミンに基づくバインディングマトリックスは、「大きな」プラスチック表面に非常によく適合する、しかしながら、被覆面の面積が小さくなると、検査の精度が低下する。新しい検査システム——例えば古典的な

ELISAや光学的または電気化学的センサーによる定量—
—においては、小規模化の必要性が増大している。

ストレプトアビジン単分子層はBlankenburgら (Biochemistry 28 (1989), 8214) およびAhlersら (Thin Solid Films 180 (1989) 93-99) の論文に記載されているが、これらはLangmuir-Blodgett (LB) フィルムを基礎とする。このため、まず第一に、ビオチン脂質単分子膜を複雑なフィルムバランス技法で作成し、続いてこれをストレプトアビジン溶液とともに約2時間インキュベートしなければならない。上記LBフィルムのもう一つの欠点10は、特に完全な乾燥に関して安定性に限界がある点である。

保持材上に固定化層を調整するもう一つの方法は、いわゆる「自己集合単分子層」(SAM)である。すなわち、NuzzoおよびAllara (J. Am. Chem. Soc. 105 (1983), 4481-4483) は、高密度に詰まった単分子層をもたらし金への有機ジスルフィドの吸着を記述している。このような単分子層が自然発生的に構成されること(従ってSAMと表現される)は、保持材と吸着物質との間の強固で特異的な相互作用に基づく。BainおよびWhitesides (Angew. Chem., 01 (1989), 522-528) は、長鎖チオール10の金表面への吸着によって形成されるSAMを記述している。このように高密度に詰まった単分子層は、下記の構造式を有するチオールを希薄な有機溶媒溶液(例えば1mmol/l)として、これと金表面をインキュベートすることによって得られる。



R=アルキル、ビニル、ハロゲン、カルボン酸、エステル、アミノ、ニトリル、OH、エーテル

このような単分子層は、乾燥状態、水中、またはエタノール中で、室温が数カ月間安定である。70°C以上の温度に加熱すると、脱着が起こる。単分子層の安定性は、チオールの炭素鎖長に伴って増加する。またこのような単分子層は希薄な酸(たとえば1N HCl)または希薄な塩基(たとえば1N NaOH)に対しても、ある程度の期間(1~7日)耐性である。

EP-A 0 339 821は金属表面を被覆するポリマーを開示する。このポリマーは、固体保持材への結合媒介としてチオール基を、またビオチンのような適当な固相反応物質と結合し、さらにこれにストレプトアビジンを結合させるためにアミノ基を、含有する。しかしながら、チオール基を含有するこのようなポリマーを用いる場合でも、そのポリマーの性質によって厳密に均一な被覆を得ることは不可能である。

Ebersoleらの論文 (J. Am. Chem. Soc. 122 (1990), 3239-3241) は、アビジンおよびストレプトアビジンの金および銀表面への直接吸着による、これらタンパク質の機能的に活性な単分子層を開示する。この方法では、高密度に詰まったバインディング層が形成されるが、このバ

インディング層をビオチニル化した結合相手とともに20分という比較的長時間インキュベートしても、この結合相手によって生じる被覆は非常に不完全である。

以上要約すると、先行技術に於て記述された単分子層に基づくバインディング層は、フリーの反応物質との結合が非常に遅いか、あるいは反応物質との結合による被覆程度が非常に低いかのいずれかであることが確認された。したがって、本発明の目的は、先行技術の上記欠点を少なくとも部分的に除去することである。とりわけ、可能な限り顕微鏡的に均一であり、可能な限り短時間に可能な限り大量のフリーの反応物質と結合できるような、多用途に用いられる単分子層に基づくバインディング層を提供することを意図するものである。

本発明の目的は、保持材、およびアンカー部を介してこの保持材に吸着され、少なくとも一つの反応相手に対して結合能を有する固相反応物質を含有する、バインディングマトリックスによって達成される。ここにおいて、固相反応物質は、希薄で、実質上横方向に均一なバインディング層を保持材の表面上に形成する。

望ましい実施態様に於て、上記単分子層は一種類の分子で構成されるが、表面はそれによって完全には覆われない。固相反応物質による被覆の程度は、単分子層の実際の厚さを、ぎっしり詰まった場合の層の厚さの理論値で割った商で表すことができる。

固相反応物質による単分子層被覆の程度は、100%未満であるが、0.1~90%が望ましく、0.5~70%がさらに望ましく、そして1~40%が最も望ましい。

本発明のバインディングマトリックスにおいては、現状の技術水準である高密度に詰まった層とは対照的に、保持材表面上の個々の固相反応物質分子間に比較的広い空間があり、それによって、疎らに分散した単分子層、即ち、希薄な単分子層となる。本発明のバインディングマトリックス表面の希薄な単分子層に基づくバインディング層は、液相由来のフリーの反応相手とより速く結合王することを可能にし、驚くべきことに、より高い結合能力によって特徴付けられる。

本発明のバインディングマトリックスの保持材は、金属、金属酸化物、またはガラス表面を有することができる。保持材は金属表面を有することが望ましく、貴金属表面を有することがさらに望ましい。金表面を有する保持材の作成は、例えば、結合媒介物質としてクロムをガラス表面に蒸着させることによって行われる。これによって厚さ約0.1~10nmの層が形成される。つぎに、このクロム層を金で被覆して、本発明のバインディングマトリックスのための保持材表面にあたる金属層を形成する。この金属層の厚さが約10から100nmであることは、このバインディングマトリックスを表面プラズモン共鳴に用いる場合に、好都合である。例えば電気化学的センサーのような他の応用に関しては、バインディングマトリックスはもっと厚くてもよい。

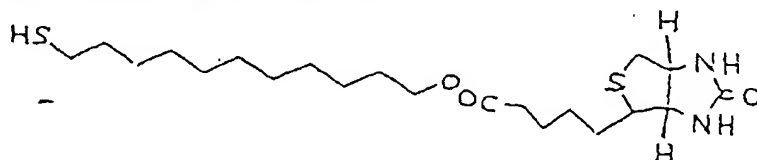
固相反応物質の保持材表面への吸着は、アンカー部を介して行われる。アンカー部の種類は、各々の保持材表面に応じて決まる。金属表面を有する保持材に関しては、チオール、ジスルフィド、またはフォスフィン基が、アンカー部として適している。例えばチオールまたはジスルフィド基は、金または銀表面に特に適しており、フォスフィン基はパラジウム表面に適している。保持材が金属酸化物表面（例えば Al_2O_3 ）を有する場合、カルボン酸またはスルホン酸がアンカー部として適している。ガラス/ケイ素表面およびヒドロキシル化表面、例えばSiについては SiO_2 、Alについては Al_2O_3 、の場合には、アンカー部として有機ケイ素化合物を用いる。トリクロロシランの使用が望ましい（Sagiv, J. Amer. Chem. Soc. 102 (1980) 82）。

固相への吸着に関して、アンカー部が固相反応物質に直接付いているのではなくて、むしろスペーサー分子、望ましくはフレキシブルスペーサー分子を介して固相反応物質に結合することが望ましい。スペーサー分子は構造式 $(CH_2)_n$ のアルキレンを含有することが特に望ましく、ここでnは1から30までの自然数を表すが、2から30までが望ましく、2から15までがさらに望ましい。スペーサー分子の一端は、保持材表面への吸着に適したアンカー部（例えばチオール基やジスルフィド基）を含有する。スペーサー分子は、保持材から離れた方を向い*

* ている他端には、固相反応物質またはその構成部分とスペーサー分子との結合の媒介となる結合部を1個または数個含有する。このような結合部は、例えばアミノ基やヒドロキシル基であってよく、これらは例えば固相反応物質のカルボキシル基と結合してエステルまたはアミドを形成する。しかしながら、スペーサー分子は、結合部としてカルボキシル基を含有してもよく、これがさらに固相反応物質の反応性アミノ基またはヒドロキシル基と結合する。

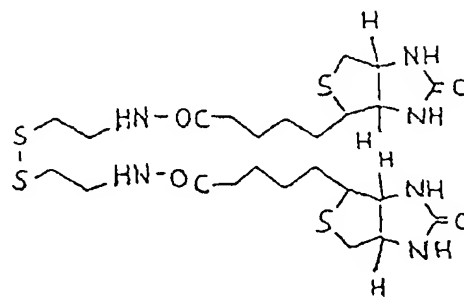
10 固相反応物質の希薄な単分子層を有する本発明のバインディングマトリックスを作成するいくつかの方法が存在することを明らかにしなければならない。これらの方法のいくつかを以下に述べるが、この文書によって本発明の範囲は限定されないものとする。

しかしながらまず最初に、本発明によらない、固相反応物質の高密度に詰まった単分子層について述べることにする。ヒドロキシル基またはアミノ基を有する脂質をBainおよびWhitesides (Angew. Chem. 101 (1989), 522-528) を論文に従って活性化ビオチン誘導体と反応させると、このような層が得られる。これによって、11-ヒドロキシウンデカン-1-チオールを出発物質として用いる場合には、以下の構造式を有するビオチニル化脂質が形成される：



金表面を有する保持材に上記脂質を飽和するまで吸着させると、ビオチンに関して100%被覆の密に詰まった単分子層が形成されることが、厚さの測定によって、明らかになった。このようにして、堅いバインディングマトリックスが得られるが、このようなマトリックスは本発明に従っておらず、またフリーの反応相手（この場合ストレプトアビジン）に対して低い結合能しか持たない。

これに対して、本発明に従うバインディングマトリックスは、同時に二分子またはそれ以上の固相反応物質（二分子が望ましい）と結合するスペーサー分子を用いることによって作成することができる。このようなスペーサー分子の例としては、アンカー部としてジスルフィド基を含有し、結合部として二つのアミノ基を含有するシスタミンがあり、これはしたがって、活性化されたビオチン二分子と結合することができる。これによって以下のような構造式を有するビオチニル化脂質が形成される：

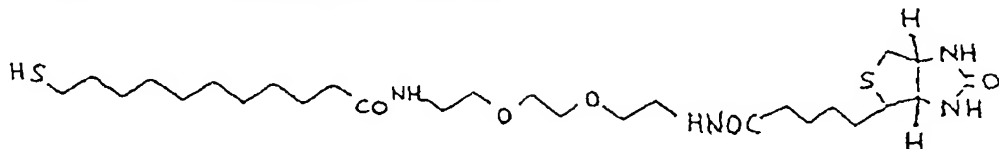


金表面への吸着に際しては、このビオチニル化脂質はビオチンについて被覆率30%の本発明にしたがったバインディングマトリックスを形成し、高い親和性でフリーの反応相手（ストレプトアビジン）と結合して、高密度のフィルムを形成することができる。

本発明のバインディングマトリックスを作成するさらに別の可能性としては、スペーサー分子と固相反応物質との間への親水性リンカー部の組み込みがある。このリンカーは特に、鎖長4から15原子の直鎖分子である。この場合、一または数個の親水性エチレンオキシドユニッ

ト(1から5まで望ましい)を有するリンカー部が望ましい。親水性リンカー部は、アミノ末端またはヒドロキシ末端ポリエチレンオキシドから作られるのが望ましい。

nが2から15までの自然数である構造式(CH₂)_nのアルキレンおよび結合部を含んでなるさらに別のスペーサー分子を、親水性リンカーと固相反応物質との間に組*



この化合物は、金表面に吸着させたとき、ビオチンに関する被覆率19%の単分子層を形成し、高い親和性で、非常に短時間にフリーの反応相手(ストレプトアビジン)と反応することができるので、その結果高密度に詰まったフィルムが得られる。したがって、親水性リンカー部を介してスペーサー分子が固相反応物質に結合している本発明のバインディングマトリックスは、本発明の範囲の中でも特に望ましい。

望ましい実施態様に於て、本発明のバインディングマトリックスは、アンカー部を有するが固相反応物質とは結合しない、さらに別のスペーサー分子を含有する。このような化合物は以下のように希釈分子を意味する。例えば、ビオチニ化および非ビオチニ化スペーサー分子を1:10から1:2の割合で用いると、フリーの反応相手と速い反応速度で高容量に結合することができる希釈されたビオチン単分子層が得られる。

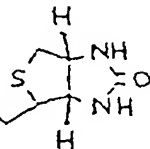
適当な希釈分子は、アンカー部およびスペーサー成分、さらに必要ならばリンカー分子を含有し、それによってスペーサー分子のCH₂の個数は、固相反応物質と結合状態で存在するスペーサー分子のCH₂の数と比べて、1-5以上、望ましくは1-2以上異なることはない。さらに、希釈分子の最小鎖長は6原子(アンカー部と親水性リンカー部なしで)が適当であることが判明した。

アンカー部から最も離れた希釈分子の末端に固相反応物質の代わりに、例えば、ヒドロキシル基、カルボン酸、カルボン酸エチルエステルまたはメチルエステル、カルボン酸アミド、1または2個のメチルまたはエチル基で置換されたカルボン酸アミド、スルホン酸またはスルホンアミドのような、親水性の原子団が存在することが望ましい。(上記で定義されたような)親水性リンカーまたは親水性リンカーの一部が、アンカー部から最も離れた希釈分子末端に結合していることも望ましい。結論としては、望ましい希釈分子は、そのスペーサー成分の一端に保持材と反応し得るアンカー部を含有し、他端に親水性の末端部を含有する。

本発明の別の実施態様に於て、固相反応物質を有するスペーサーと固相反応物質を持たないスペーサーを共有結合によって結合させることができる。金または銀表面

*み込むことができれば望ましい。

1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンが特に好適なリンカーであることが判明した。したがって、C₁₁-チオールスペーサー分子とビオチンの間に1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンを組み込むことにより、下記の構造式を有するビオチニ化化合物が形成される:



を用いた場合、この結合はジスルフィド橋で行うことが望ましい。

希釈分子(固相反応物質を含まないスペーサー分子)および固相反応物質を有するスペーサー分子からなるこのような混合単分子層に於いては、固相反応物質を有するスペーサー分子の比率は約0.1-90モル%、望ましくは0.5-50モル%、さらに望ましくは1-40モル%である。

ここまで述べてきたすべてのバインディングフィルムに於いて、固相反応物質は一成分から構成される。この成分は、ビオチンまたは、ビオチンに類似した、デチオビオチン、イミノビオチン、またはHABA(4-ヒドロキシフェニルアゾ安息香酸)のような、やはりストレプトアビジンと反応する分子が望ましい。

適当な固相反応物質の別の例としては、抗体と結合することができる抗原またはハプテンである。この場合、固相反応物質は、分子量100から1200のハプテンであることが望ましい。ステロイド(例えば、ジゴキシニン、ジゴキシゲニン、コルチゾール、エストリオール、エストラジオール、テオフィリン、ジフェニルヒダントイン、テストステロン、胆汁酸、プロゲステロンおよびアルドステロンなど);短鎖ペプチド(例えば、アルギプレッシン、オキシトシン、およびブラジキニンなど);フルオレセインおよびその誘導体;T₃、T₄、アフラトキシン、アトラジン、例えばジベレリンなどの植物ホルモン;アルカロイド(例えば、レセルピンおよびアジマリシンなど)が、適したものの例である。

ビオチンおよびビオチン誘導体、ジゴキシニン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、および誘導体、並びにテオフィリンが、ハプテンとしての使用に特に望ましい。

一方、固相反応物質は複数の成分からなってもよい。このことは特に、固相反応物質の内部の成分がスペーサー分子に共有結合し、固相反応物質の外側の成分とは非共有結合すること意味すると考えられる。この場合、固相反応物質の外側の成分はフリーの反応相手と結合する能力を有する。内部成分は例えばビオチンであって、外部成分がストレプトアビジンでもよい。このようなバインディングマトリックスは、他方では、溶液中のビオチ

ニル化された反応相手と結合することができるが、これはストレプトアビジンがビオチンに対して4個の結合部位を有し、そのうち最低2個はなおフリーであるためである。

二成分を含んでなる固相反応物質を含有する単分子層は、その固相反応物質の外部成分、すなわちフリーの反応相手と結合する能力を有する成分（特にこの場合、ストレプトアビジン）が、バインディングマトリックスの表面に希釈された層を形成する場合には、本発明にしたがったバインディングマトリックスとなる。固相反応物質の内部成分は、固相反応物質の外側成分がこれと結合して希釈された層を形成することができるような、希釈されない層をバインディングマトリックスの表面に形成することが望ましい。

したがって、高密度に詰まった、被覆率100%のビオチン単分子層（それ自体は本発明のバインディングマトリックスにあてはまらない）は、被覆密度27%でストレプトアビジンと結合する。その後、さらにこの希釈されたストレプトアビジン層は、フリーの反応相手、例えばビオチン抗体と結合して高密度フィルムを形成することができる、本発明に従ったバインディングマトリックスに相当する。例えばスペーサーとリンカーを有する固相反応物質を用いることによって作成され、フリーのストレプトアビジンと結合する本発明のバインディングマトリックスにそれ自体当てはまる、希釈されたビオチン単分子層（実施例8参照）は、ストレプトアビジンと結合して被覆率100%の高密度フィルムを形成することができる。しかしながら、このようにして形成される高密度ストレプトアビジン層は、本発明のバインディングマトリックスに相当せず（なぜならば、柔軟性がな

い）、反応相手（例えばビオチン抗体）と結合して、約10%被覆率のフィルムを形成するのみである。希釈された結合可能な固相反応物質を用いた本発明のこのような技法を、ビオチン-ストレプトアビジン結合以外に、例えば抗原-抗体などの他の結合ペアに適用拡大することができる。

バインディングマトリックスの表面の固相反応物質による被覆の程度は、単分子層の厚さを測定することによって定量することができる。この場合、測定された層の厚さは、単分子層の被覆率の低下にともなって減少する。したがって、固相反応物質としてビオチンを有する下記の単分子層は、厚さ0.7nmであるが、これより、この厚さは分子長から計算された3.7nmより少ない。固相反応物質としてストレプトアビジンを有する単分子層も記載されているが、その厚さは0.5nmであり、ストレプトアビジン分子の直径よりもかなり少ない。

本発明は、また、本発明のバインディングマトリックスを作成するための方法に関する。本発明のバインディングマトリックスの性質が異なるため、その作成方法も細部に異なる。このような作成方法のうち、望ましい

いくつかの変法が実施態様に記載される。概括すると、本発明による方法は、本発明のバインディングマトリックスの単分子層を形成する分子の存在する反応溶液と保持材とをインキュベートすることを含んでなる。これらの分子は、相反する側にアンカー部と固相反応物質を有する（それによって、本発明の一部の実施態様に於いて、単分子層のすべての分子が固相反応物質と結合しなければならないということはない）。固相反応物質はスペーサー分子を介してアンカー部に結合されるのが望ましい。本発明のバインディングマトリックスを形成する、溶液から保持材へのアンカー部の結合は、自発的過程である。

第一の単分子層を作成するための保持材と反応溶液とのインキュベートは、保護的なガスのもとで行うことが望ましく、できれば H_2O や O_2 のような妨害物質を含まない、不活性溶媒中で行うことが好適である。

もし必要ならば、特に固相反応物質が相互に非共有結合するいくつかの成分からなる場合には、さらに別の物質を、第二の反応溶液とともにインキュベートすることによって第2段階に入れることができる。第二の、そして必要ならばさらに別の層を付けるための反応条件は厳しくはなくて、保護的なガスを使用する必要はなく、溶媒として水を用いることができる。

本発明の方法にしたがって作成された側面の単分子層は顕微鏡的に均一で、例えば、表面プラズモン顕微鏡検査法によって測定することができる（B.RothenhauslerおよびW.Knoll, Surface Plasmon Microscopy, Nature, Vol. 332, No. 6165, p. 615-617 (1988); W.Hickel, B.RothenhauslerおよびW.Knoll, "Surface Plasmon Microscopic Characterisation of external surface", J. Appl. Phys. (1989), P. 4832-4836; W.Hickel, W.Knoll "Surface Plasmon optical characterisation of lipid monolayers at 5 μ m lateral resolution", J. Appl. Phys. 67 (1990), P. 3572 ff.). 5 μ mの分解能で、測定可能な厚さの相違は存在しない。

さらに本発明は、試料溶液中の分析対象物を、バイオアフィニティを有する少なくとも二つの反応物質間の特異的な結合反応によって定量する方法に関する。二つの反応物質の一方は、固相に結合して存在し、他方の一方または複数の反応相手はフリーであって、それによって本発明のバインディングマトリックスの成分である固相反応物質が利用される。

このような過程に於て、フリーの結合相手がマーカ部を有することによって、このフリーの反応相手と固相反応物質との結合を検出することが可能となる。標識化には通常、酵素、または蛍光あるいは発光成分を用いる。これによって、結合を間接的に光学的に観察することが可能になり、したがって正確な定量が可能となる。

基本的に、結合は、光学的、電気化学的に、また実熱量測定や質量変化によっても、定量することができる。

電位差測定および電流測定は、"Biosensors", Turner, Karube, Wilson (編)、Oxford Press, 1987またはBergveld, Biosensors & Bioelectronics 6, 55-72 (1991)に記載された技法のように、電気化学的技法として特に考慮に値する。電気伝導度または静電容量の変化による定量も、電気化学的技法として実行可能である。

しかしながら、結合の定量は光学的に、とりわけ光反射技法によって行うことが望ましく、そのような方法によって、フリーの結合相手の結合によって引き起こされる、保持材結合反応物質のきわめて薄い層の厚さの増加を観察することができる。このような技法に関する総説は、Sadowski: "Review of optical methods in immunosensing, SPIE, Vol. 954 Optical testing and Metrology II (1988), 413-419によって与えられる。

特に望ましい光反射法としては、表面プラズモン共鳴による結合の検出がある。この方法に於て、分析成分は、固相反応物質を担うきわめて薄い電導性金属層で覆われた光透過性誘電物質から構成される。この分析成分は、しばしば光学イムセンサーと称される。このような*

* 光学イムセンサーの例は、EP-A 0 112 721, EP-A 0 276 142, および EP-A 0 254 575に記載される。しかしながら、実施例4で述べるイムセンサーは、固相への結合の定量的検出に、特に優れているとおもわれる。このようなイムセンサーの原理の詳細はDE 40 24 476に示され、これに添えてこの開示に言及する。

第1から第3図とともに以下の実施例によって、本発明をさらに説明することとする。

第1図は、固相へのフリーの反応相手の結合を測定するために使用することができる、測定装置の模式図である。

第2図は、ある成分を固相反応物質および希釈分子と組み合わせることによって作成されたバインディングマトリックスの厚さ、並びにこれに結合したストレプトアビジンの厚さを示す（実施例23および24）：

曲線1: ビオチン層の厚さ

曲線2: ビオチンのモル分率Xに関する、ストレプトアビジンに起因する厚さ増加の依存関係

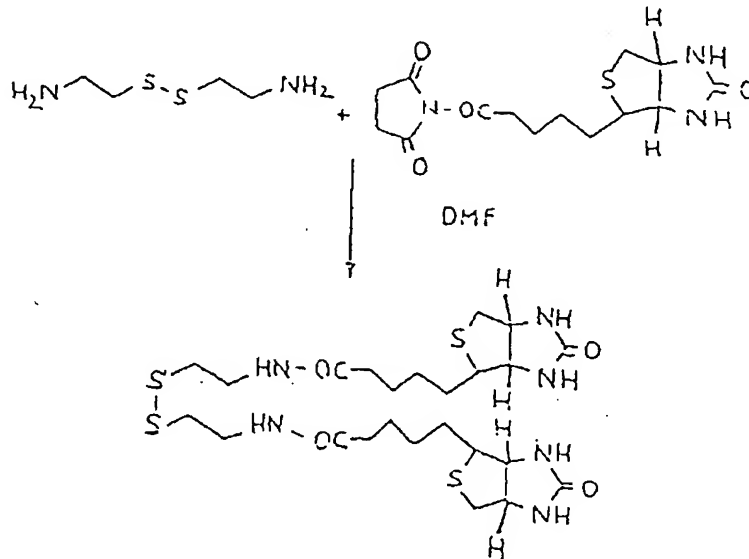
$$X = \frac{C_{\text{ビオチン化合物5}}}{C_{\text{ビオチン化合物5} + \text{希釈分子}}} : 2$$

C : モル濃度

第3図は、本発明にしたがって作成されたビオチン化合物およびビオチン誘導体の一覧を示す。
実施例1

* ビス-ビオチノイルシスタミン（ビオチン化合物1）の合成

※30



ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルを、ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解した二塩化シ

スタミニウムおよびトリエチルアミンに添加した。この反応混合物を室温で一晩攪拌した。反応が完了した後、

15

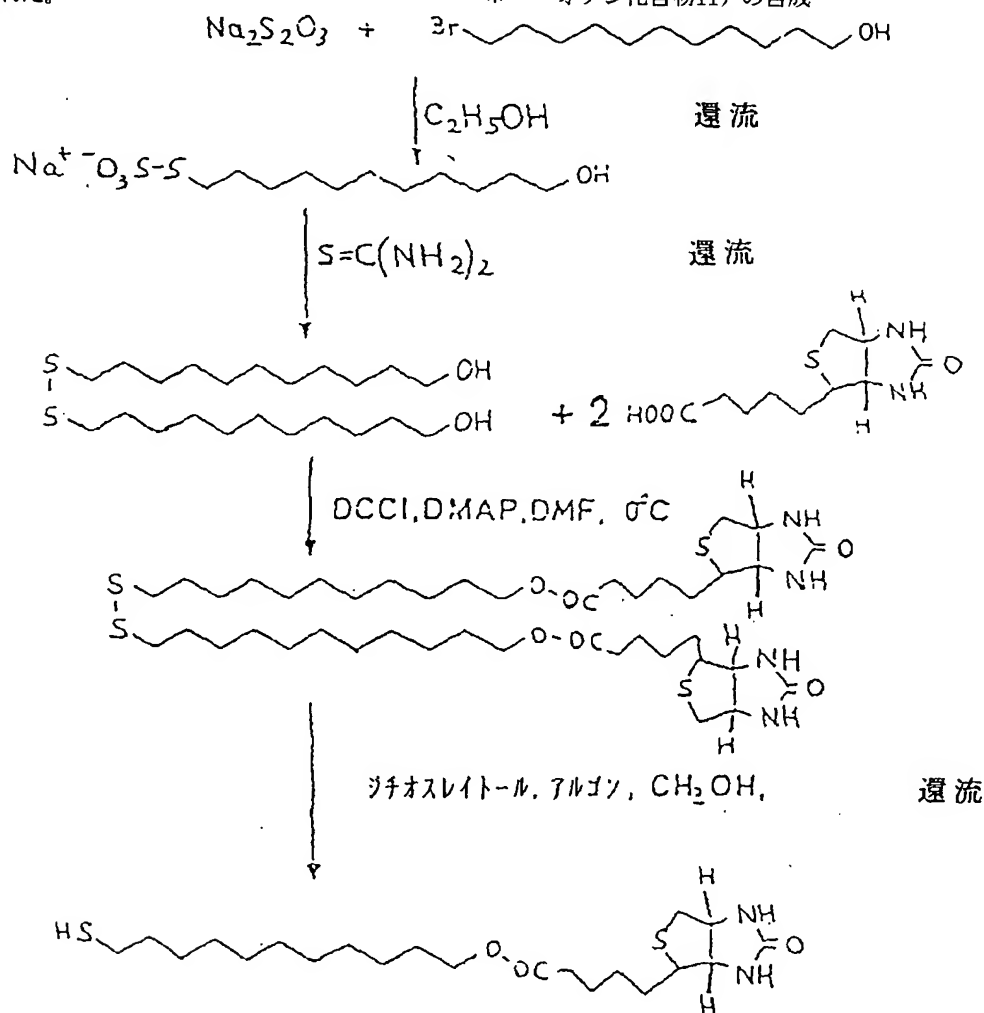
16

形成された沈澱を濾別し、オイルポンプを用いて乾燥し、アセトンで再結晶した。目的の化合物が、40%の収率で得られた。

* 実施例2

*

ビオチン (11-メルカプト) ウンデカニルエステル (ビオチン化合物II) の合成



ブロウンデカノール (Merck) を原料として、そのエタノール溶液を4時間還流し、チオ硫酸ナトリウムの飽和水溶液をゆっくりと滴下して加えることによって、対応するBunte塩を合成した。冷却によって、その塩を溶液から結晶化し、エタノールで再結晶することによって精製した。

このBunte塩を原料として、予め塩酸でpH1に調整したチオウレア水溶液とともに煮沸させることにより、98%の収率で対称ジスルフィドを調整した。次に、冷却によって反応混合物を結晶化する。

このジスルフィドを、ビオチンおよび10モル% 4-ジメチルアミノ-ピリジン (DMAP) とともに、加温によってDMFに溶解し、 -15°C でDMFに溶解したジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCl) を添加することにより、エステル化を開始した。5時間後、反応物を室温に戻し、さ

らに18時間攪拌した。反応が完了した後、オイル真空ポンプで室温でDMFを除き、残留物をフラッシュクロマトグラフィーで精製した。11,11'-ビス-ビチニルエステル-ウンデシル-1,1'-ジスルフィドが、13%の収率で得られ、対応する一置換産物が23%の収率で得られた。

次に、このビオチニル化ジスルフィドを、アルゴン雰囲気下、沸騰メタノール中で、ジチオスレイトール (DTT) を用いて還元した。反応完了 (24h) 後、反応混合物を蒸発乾固し、生成したジスルフィドスレイトール、並びに過剰DTTを少量の水で抽出して除去した。次に、この混合物をフラッシュクロマトグラフィーで分離し、目的生成物を80%の収率で単離した。

実施例3

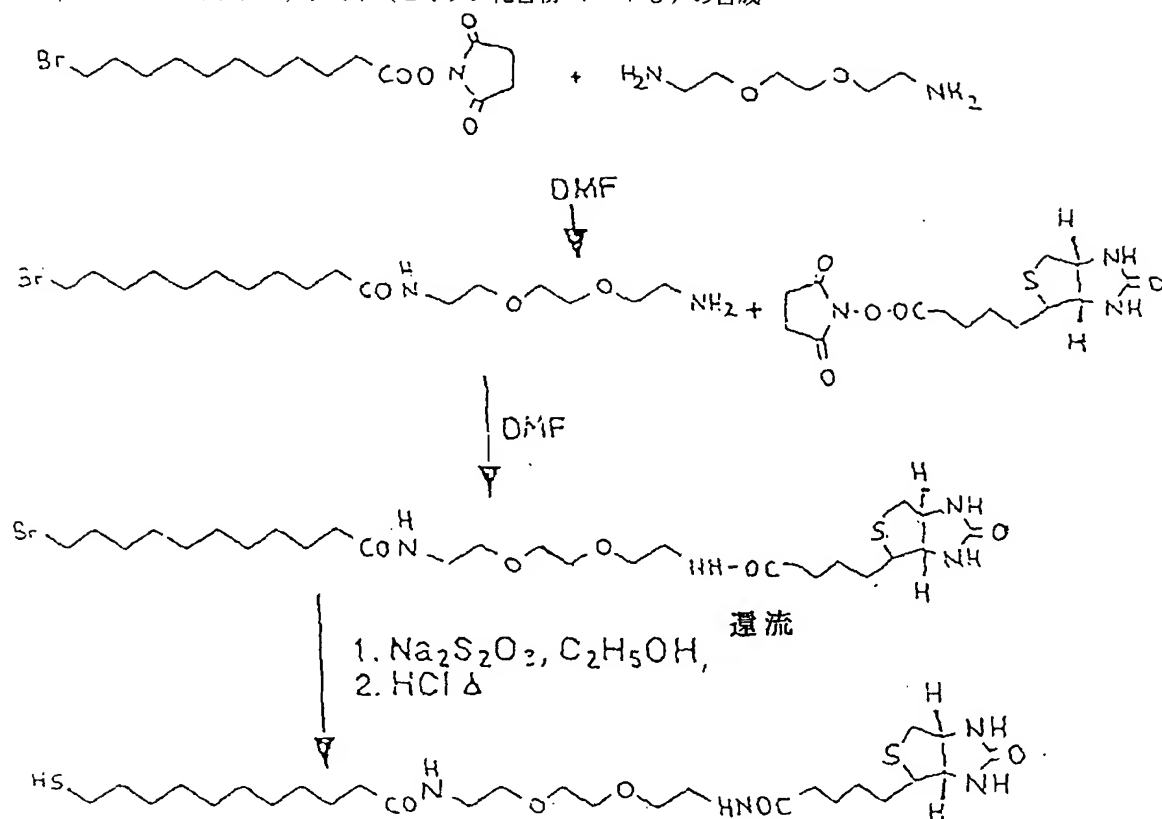
11-メルカプトウンデカン酸- (8-ビオチノイルアミ

40

50

17
D-3,6-ジオキソオクチル) アミド (ビオチン化合物 * * 3) の合成

18



11-ブロモウンデカン酸の活性エステルを、冷却下で、過剰な1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタン DMF溶液と反応させた。反応終了後、沈殿したN-ヒドロキシスクシンイミドを濾別し、過剰のアミンをDMFとともに、オイル真空ポンプで除去した。

次に、得られた中間体をビオチン活性エステルとDMF中で再度反応させた。生成したアルキルブロミドを、反応終了後フラッシュクロマトグラフィーで単離した ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}:1/1$)。

粗生成物をBunte塩に変換し (実施例2参照)、次にアルゴン下で1N塩酸により加水分解した。生成した硫黄を除去するために、この溶液を加熱濾過した。続いて、濾液を蒸発乾固し、粗メルカプタンをクロロホルム/エタノールで抽出し、その抽出液を蒸発濃縮して、フラッシュクロマトグラフィーにより単離した ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}:1/1$)。目的生成物が3%の収率で得られた。

実施例4

ビオチン化合物1からのビオチン単分子層1の生成

接着剤としてのクロム (1nm) と、金 (41nm) を蒸着させた高屈折率ガラスSF57製顕微鏡スライドガラスを、固体保持材として用いた。ビオチニル化したジスルフィド (実施例1より) を $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}:1$ の $6 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$ (M) 溶液として、使用した。この顕微鏡スライドガラ

スを2時間、アルゴン保護ガス雰囲気下に反応溶液中でインキュベートし、次に溶媒のみで完全にすすぎ、アルゴン気流下で乾燥させる。被覆された試料を、改変クレッチマン装置 (第1図) に組み込むと、空気のみならず水性媒体に対しても耐性の特性を与えることができる。

第1図は、固相へのフリーの反応相手の結合を光反射法で定量するための測定装置の模式図である。

この光反射法測定装置は、レーザー10を含有する。そのレーザーによって発せられる一次光線11は、表面の法線17に対して角度 θ で被験領域20に向けられている。反射光の像は、焦点面に位置するダイオード13上に、集束レンズ12によって形成される。

さらに、この測定装置は、クレッチマン構造の中にプリズム16を含有し、被験溶液の流入流出口15を有するフローキュベット14を含有する。

被験領域20は、クレッチマン構造内のプリズム16、誘電性、光透過性保持層22、および保持層22に蒸着した金属薄層23a, 23bからなる。屈折率液の薄層21がプリズム16と光透過性保持層22とを光の屈折なしにつないでいるが、これは21の屈折率がこれら二つの部材の屈折率と同じためである。この場合、23aは、上記のクロム層を表し、23bは蒸着された金属層を表す。25は、固相反応物質26のアンカー部を介した金表面への結合の連結役をする

30

40

50

スパーサー分子を表す。27は、固相反応物質と結合能を有する、被験相28に存在するフリーの反応相手を表す。

フレネルの式を用いて、境界面での反射を計算し、PSP分光法データに当てはめることができる。これによって、各層の「光学的な厚さ」($=n^2 \times d$, ここで n = 屈折率、および d = 厚さ)の値が得られる。チオアルカンの屈折率が $n = 1.45$ であると仮定すると、吸着されたジスルフィドの厚さは 0.5nm ということになる。約 1.6nm という理論値との比較により、表面の被覆が非常に不完全であることが示される。

したがって、約30%の表面被覆率の、「希釈された」ビオチンフィルムが得られる。

実施例5

ビオチン単分子層1へのストレプトアビジンの結合/ストレプトアビジン単分子層1の作成

ビオチニル化された固定化層の反応性を調べるために、 0.5MNaCl 水溶液(対照として)を、 $\sim 5 \times 10^{-4}\text{M}$ ストレプトアビジン溶液に置き換える。

続いて、ストレプトアビジンによる分子認識反応は1時間以内に厚さ 3.0nm 増加の飽和値に達する。これはタンパク質の屈折率 $n = 1.5$ に基づく。実際の光学上有効な屈折率はこれより低いと思われるが、これは吸着されたタンパク質分子の間の空間が水($n = 1.33$)で満たされているためである。この事実を考慮にいれるならば、観察された厚さの増加は、ストレプトアビジン微細結晶*

$$I = I_{\infty} [1 - \exp(-t/\tau)]$$

I_{∞} : $t = \infty$ の時の強度

τ : 時間定数

時間定数 τ は、吸着が飽和値の $1/e$ に近づく時間であるが、この実験では約13分である。

この結果ストレプトアビジン層は 0.8nm であり、これはタンパク質によるきわめて不完全な被覆に相当する。層の均一性はPSP顕微鏡検査によってモニターすることができ、その結果不均一は見いだされなかった。したがって、このタンパク質は、非常に薄くはあるが、それに関わらず均一な層として蓄積する(横方向からの約 $5\mu\text{m}$ の解像力に関して)。

この場合、被覆率約27%の「希釈された」ストレプトアビジンフィルムが与えられる。

実施例8

ビオチン化合物3からのビオチン単分子層3の作成

実施例3の、スパーサーを有するビオチニル化チオールを、 $1.25 \times 10^{-4}\text{M}$ の溶液から吸着させた。それ以外の調製条件は実施例4と同様である。

タンパク質吸着が完了し、水性環境に対する層システムの特性を検討した後、 0.5MNaCl 溶液で試料を完全にすすぎ、窒素気流下で乾燥した。空気に対してPSP分光法

*に関するラジオグラフの値($d \sim 4.5\text{nm}$)とほとんど同じ程度であった。

実施例6

ビオチン化合物2からのビオチン単分子層2の作成

調製は、ほとんど実施例4にしたがって行われた。相違点は、チオールの固体保持体への吸着についてのみであった。したがって、この場合溶液の濃度は $4 \times 10^{-4}\text{mol/l}$ であり、インキュベーションは6時間続いた。

空気に対して得られたチオール層の厚さは 3.0nm であり、水性環境に対して得られた値は 3.2nm であった。約 $\pm 0.2\text{nm}$ の測定誤差、および水相の屈折率の振れの可能性を考慮すると、この厚さは、約 $\sim 2.8\text{nm}$ の理論値ときわめてよく一致する。

この場合被覆率100%の、密に詰まったビオチンフィルムが与えられる。

実施例7

ビオチン単分子層2へのストレプトアビジンの結合/ストレプトアビジン単分子層2の作成

ストレプトアビジンの結合は、共鳴カーブの(横方向の)変位を通じてオンラインでモニターすることも可能であり、速度論的データも利用できる。

吸着による厚さの増加について、単指数関数的時間経過を想定した場合、時間に対する反射強度の依存関係について以下が与えられる。

を再び行った後、このようにして環境の変化やすぎによって引き起こされる可能性のある変化を検出するために、試料を再び水性の環境にさらす。

得られたビオチニル化チオール層の厚さは、空気に対しても、水性環境に対しても 0.7nm であった。この値は、理論値 $\sim 3.7\text{nm}$ とは比較にならず、実際、分子は疎らに分散し、まったく不完全な層を形成している。

この場合、約19%被覆率の「希釈された」ビオチンフィルムが、再び与えられる。

実施例9

ビオチン単分子層3へのストレプトアビジンの結合/ストレプトアビジン単分子層3の作成

この場合、ストレプトアビジンの吸着はきわめて迅速である。厚さの増加について、同じ単指数関数的時間経過を想定するならば、この場合わずか1分という時間定数 τ が得られる。

ストレプトアビジン層は、全集が 3.1nm に達し、PSP顕微鏡検査下では、非特異的に吸着したタンパク質凝集体で表面をおおわれているように見える。対応する相です

すぎを行い乾燥することは、層システムを損なうことにはならず、厚さ（空気に対する）は、3.0nmとほとんど一定のまま残存する。キュベットを、再び水相でみたした後では、フィルムは顕微鏡的に均一に見える。

実施例10

ビオチニル化抗体のストレプトアビジン単分子層2および3への結合

ストレプトアビジンは、四量体タンパク質として、ビオチン/ビオチニル化分子に対して4個の結合部位を有する。固定化層に結合した後、幾何学的な考察にしたがって、さらに認識反応に利用可能な、水相に向けられた二つの結合部位があるはずである。このことを、TSHに対するビオチニル化抗体、対応する非修飾抗体（対照として）、および試料として対応する抗原TSHについて調べた。EP-0344578の実施例2に記載のように、免疫定量反応を実施した。ビオチニル化抗体を 1×10^{-6} M水溶液から様々な調製ストレプトアビジン層に吸着させた。この場合得られた結果は、ストレプトアビジン層の各々の厚さ、すなわち充填密度ときわめて依存的关系にあるとおもわれる。

このように、実施例9の、3.0nmの密に詰まったスト

レプトアビジン単分子層3にビオチニル化抗体を吸着させると、0.5nmというわずかな厚さの増加しか得られない。この方法は、初期に厚さの減少をとまうが、これは十分しっかりと結合していなかったストレプトアビジンの脱着によって引き起こされると推定される。その後起きる厚さの増加は、時間定数 $\tau \sim 3$ 分で起こる。

しかしながら、ビオチニル化抗体を、実施例7の、0.8nmのストレプトアビジン単分子層2に同様の条件下で吸着させるならば、これは全体として5.1nmの厚さの増加をとまう非常に強い効果に帰着する。反応速度論をもっと詳しく調べると、初期にわずかな厚さの減少がみられ、その後非常に強い吸着が観察される。この場合、反応速度論を、二指数関数によって特性解析する必要がある。最初の時間区分は、時間定数 $\tau \sim 5$ 分を与える。

高密度のストレプトアビジン単分子3層は、「希釈された」ストレプトアビジン単分子層2よりもゆっくりとビオチニル化抗体を結合する。さらに、「希釈された」ストレプトアビジン単分子層2は、単位面積当たりかなり高い結合能力を有する。したがって、達成可能な時間当りの測定効果は、「希釈された」ストレプトアビジンフィルムの方が、大幅に大きい。

10

20

表

バインディングフィルム

被覆度

親水性スベーパーのビオチンに対する結合能力

結合の速度論

23

ビオチン単分子層 1^{a)}

30%

なし

ストレプトアビジンと結合して
高密度フィルムを形成ビオチン単分子層 2^{b)}

100%

なし

ストレプトアビジンと結合して27%被覆率
のフィルムを形成 $\tau = 13$ 分

(12)

ビオチン単分子層 3^{a)}

19%

あり

ストレプトアビジンと結合して高密度
フィルムを形成 $\tau = 1$ 分ストレプトアビジン^{a)}
単分子層 2

27%

—

ビオチニル化A bと結合して高密度
フィルムを形成 $\tau = 3$ 分ストレプトアビジン^{b)}
単分子層 3

100%

—

ビオチニル化A bと結合して約10%被覆率
のフィルムを形成 $\tau = 5$ 分

24

^{a)} : 本発明によるフィルム^{b)} : 本発明によらないフィルム

実施例11

ビスードデカン酸ジスルフィドの合成（合成は不活性ガス（N₂）下で行われる）

a) 12-メルカプトードデカン酸メチルエステル

2.3g (0.1mol) ナトリウムを200mlの脱気した無水メ

タノールに溶解する。得られた溶液を氷冷する。7.1ml (0.1mol) チオ酢酸、そして次に14.4g (50mmol) プロモドデカン酸をこれに加え、その溶液を5時間還流下で沸騰させる。室温に冷却した後、15ml濃塩酸を加え、3時間還流下で沸騰させる。続いて、冷却後、300mlエー

50

テルを加え、エーテル相を水で 3 回、飽和 NaCl 溶液で 1 回 (各回 100ml)、振盪して抽出する。有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥した後、溶媒を溜去する。

収量: 12.2g

TLC: Rf = 0.86 (シリカゲル; 酢酸エチル/石油エーテル 19/1 + 1% 酢酸)

b) 12-メルカプトドデカン酸

12.2g の 11a) の産物を 200ml の脱気した無水メタノールに溶解し、100ml の 1N NaOH を加えて、3 時間還元流下で煮沸させる。室温に冷却後、反応混合物を 400ml の氷水、20ml 濃塩酸および 600ml エーテルの入ったアイスバスに注ぐ。エーテル相を除去し、各回 300ml の水で 3 回、100ml 飽和 NaCl 溶液で 1 回、振盪して抽出し、硫酸ナトリウム上で乾燥させる。乾燥剤を濾別した後、溶媒を溜去する。

収量: 12.3g

TLC: Rf = 0.68 (シリカゲル; 酢酸エチル/石油エーテル 19/1 + 1% 酢酸)

c) ビスドデカン酸-ジスルフィド

12.0g の 11b) の産物を 170ml エタノールに懸濁し、激しく攪拌しながら、6.3g ヨウ素の 200ml エタノール溶液を滴下する。溶液が黄色になって、もはや退色しなくなったら、ただちに添加を終了する。次に、550ml エーテルおよび 350ml 水を加え、水相を除去し、再びエーテルで洗う。集めたエーテル相を飽和 NaCl 溶液とともに振盪し、硫酸ナトリウム上で乾燥させる。乾燥剤を濾過し、溶媒を溜去した後に残る残留物を、アセトンで再結晶する。

終了: 10g (理論値の 86%)

TLC: Rf = 0.57 (シリカゲル; 酢酸エチル/石油エーテル 19/1 + 1% 酢酸)

実施例 12

ビス- (ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル) -ドデカン酸アミドジスルフィド (ビオチン化合物 4) の合成

1.38g (3mmol) の実施例 11c) の産物および 1.76g (7mmol) 2-エトキシ-N-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリン (EEDQ) を、150ml THF および 150ml DMF の混合物に溶解し、次に、2.25g (6mmol) ビオチノイル-1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタン (ビオチン-DA DOO) の 40ml DMF 溶液を滴下して加える。さらに、この反応混合物を 3 時間 50°C に加熱する。続いて、それを減圧濃縮し、残留物を 100ml クロロホルムにとり、各回 100ml の水で 2 回振盪して抽出する。硫酸ナトリウム上での乾燥後、溶媒を溜去し、残留物をシリカゲルクロマトグラフィーにかける (フラッシュクロマトグラフィー、移動溶媒: クロロホルム/メタノール 9/1)。

TLC: Rf = 0.31 (シリカゲル; クロロホルム/メタノール 8/1)

MS: m/e = 1175 (pos. FAB)

実施例 13

S- (ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル) -ドデカン酸アミド-S'-ドデカン酸ジスルフィド (ビオチン化合物 5) の合成

調製は、実施例 12 と同様である。

収量: 300mg (理論値の 9%)

TLC: Rf = 0.05 (シリカゲル; クロロホルム/メタノール 8/1)

MS: m/e = 817 (neg. FAB)

10 実施例 14

ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル-12-メルカプトドデカン酸アミド (ビオチン化合物 6) の合成 (合成は不活性ガス下で行われる)

300mg (0.3mmol) の実施例 12 の産物および 0.5g (3.3mmol) ジチオスレイトール (DTT) を 100ml の脱気した無水メタノールに溶解し、不活性ガス雰囲気下で 10 時間攪拌する。次に、反応混合物を蒸発乾固し、残留物を塩化メチレンにとり、水とともに振盪する。有機相を硫酸ナトリウム上で乾燥し、蒸発によって濃縮し、残留物をフラッシュクロマトグラフィーで精製する (シリカゲル; 塩化メチレン/エタノール 1/1)。

TLC: Rf = 0.27 (シリカゲル; クロロホルム/メタノール 8/1)

実施例 15

デスチオビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

1.8g (15.5mmol) N-ヒドロキシスクシンイミドの 40ml ジオキサン溶液を、激しく攪拌しながら、40ml DMF と 40ml ジオキサンの混合液中の 3g (14mmol) デスチオビオチン (Sigma) および 3.5g (17mmol) N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド溶液に添加した。20°C で 4 時間攪拌し、それによって微細な白色沈澱が生じ、これを反応完了後 (TLC でモニターする) 濾別した。濾液を真空濃縮し、それを少量の酢酸エチル/DMF 4/1 にとり、4°C で 16 時間放置した。この過程でさらに沈澱が生じ、これを濾別した。新たな沈澱がみられなくなるまで、この段階を数回繰り返した。次に、濃縮された濾液を少量のエタノールにとり、ジイソプロピルエーテルの添加によって、生成産物を沈澱させた。濾過後、濾液を 16 時間 4°C で放置し、その間にさらに生じた沈澱を濾別した。真空下、50°C で乾燥した後、白色の微細結晶の生成物が得られた。

収量: 1.6g (37%)

TLC (シリカゲル 60): 溶離液 酢酸エチル/メタノール = 6/4

RF = 0.75

実施例 16

D-デスチオビオチノイル-1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタン、デスチオビオチン-DADDOO

50 1.6g (5mmol) デスチオビオチン-N-ヒドロキシス

27

クシンイミドエステルの溶液を、7.5ml (50mmol) 1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオクタンの50mlジオキサン溶液に、ゆっくり滴下しながら添加し、この反応混合物を16時間攪拌した。反応が完全に終了した後、この混合物をロータリーエバポレーターで濃縮して油状物を生じさせ、過剰なDADOO部分を酢酸エチル/エーテルで洗い流し、残留物をシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーで精製した。

シリカゲル60、溶離液 酢酸エチル/メタノール=6/4
+ 10%NH₃

TLC:同一溶離液、Rf=0.3

収量:0.8g (50%)

実施例17

ビスー(デスチオピオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)-ドデカン酸アミドジスルフィド

デスチオピオチン化合物1

1.6g (5mmol) デスチオピオチン-DADOO (6)、2.3g (0.5mmol) ビスードデカン酸-ジスルフィド(実施例11c)、0.74g (5.5mmol) 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、および1.14g (5.5mmol) N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドを溶解した50mlジメチルホルムアミド溶液を24時間20°Cで攪拌する。反応終了後(TLCでモニターする)、反応混合物を油状になるまでロータリーエバポレーターで濃縮し、シリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーで精製する(溶離液:クロロホルム/メタノール 9/1)。

TLC:シリカゲル60、溶離液 クロロホルム/メタノール 9/1

RF:0.4

収量:0.25g (5%)

実施例18

S-(デスチオピオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)-ドデカン酸-S'-ドデカン酸-ジスルフィド
デスチオピオチン化合物2

この化合物は、実施例17の反応混合物のフラッシュクロマトグラフィーから、白色の非結晶粉末として得られる。

TLC:シリカゲル60、溶離液 クロロホルム/メタノール 9/1

RF:0.3

収量:0.8g (20%)

実施例19

12-メルカプト-(デスチオピオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)-ドデカン酸-アミド

デスチオピオチン化合物3

200mg (0.2mmol) の実施例17の化合物および2g (13mmol) ジチオスレイトールの50mlメタノール溶液を36時間還流した。冷却後、溶媒をロータリーエバポレーターで除去し、残留物をクロロホルムにとった。次に、TLCでジチオスレイトールがもはや検出されなくなるまで十分

28

に何回も水で振盪する。クロロホルム相を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、高度の真空中で濃縮する。シリカゲルのフラッシュクロマトグラフィーによって精製した、溶離液:クロロホルム/イソプロパノール 18/2。

TLC:シリカゲル60、溶離液:クロロホルム/メタノール 9/1

RF:0.35

収量:60mg (30%)

実施例20

10 ジフェニルヒダントイン-N-プロピオンアミド-3,6-ジオキサオクチル-12-メルカプトドデカン酸-アミド

ジフェニルヒダントイン化合物

実施例16と同様に、ジフェニルヒダントイン-N-プロピオニル-DADOOは、ジフェニルヒダントイン-N-プロピオン酸(Cookら、Res.Communication in Chemical Pathology and Pharmacology 5, (1973), p.767)、および1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオktanから得られる。実施例13と同様に、対応する混合ジスルフィドは、ジフェニルヒダントイン-N-プロピオニル-DADOO、および実施例11c)によるビスードデカン酸-ジスルフィドから得られる;DTTで開裂した後、ジフェニルヒダントイン-N-プロピオンアミド-3,6-ジオキサオクチル-12-メルカプトドデカン酸が得られる。

実施例21

ビスー(ヒドロキシフェニルアゾ-ベンゾイルアミド-3,6-ジオキサオクチル)-ドデカン酸-ジスルフィド [ビスー(HABA-DADOO)-ドデカンサン-アミド-ジスルフィド]の合成

30 実施例11cの産物1.4gおよび2.4g [2-(4-ヒドロキシフェニルアゾ)-ベンゾイル]-1,8-ジアミノ-3,6-ジオキサオktan (HABA-DADOO)を用いて、実施例12と同様に合成を行う。

TLC:RF=0.65 (シリカゲル; 酢酸エチル/メタノール 4/1)

HABA-DADOOの合成は、HABA-OSuおよびDADOO(ジアミノ-3,6-ジオキサオktan)を原料として実施例16と同様に行われる。

HABA-OSuは、HABAおよびN-ヒドロキシスクシンイミドから、実施例15と同様に調製される。

40 TLC (HABA-DADOO):Rf=0.52 (シリカゲル; ブタノール/氷酢酸/水 10/3/5)

TLC (HABA-OSu):Rf=0.89 (シリカゲル; ブタノール/氷酢酸/水 10/3/5)

実施例22

(ヒドロキシフェニルアゾ-ベンゾイルアミド-3,6-ジオキサオクチル)-12-メルカプトドデカン酸-アミドの合成

(合成は不活性ガス下で行われる)

50 合成は、実施例21の産物200mgを用いて、実施例14と

同様に行われる。

TLC:Rf=0.68 (シリカゲル; 酢酸エチル/メタノール
4/1)

実施例23

ビオチン化合物5およびビス(11-ヒドロキシウンデシル)
ジスルフィドからのビオチン単分子層の作成

実施例4にしたがって、被覆を行う。金(50nm)を蒸*

混合物

ビオチン化合物5
のモル分率

スペーサーに関
するビオチンモ
ル分率

被覆率
(約 %)

「混合物」1 (ビオチン化合物5のみ)	1. 0	0. 5	5 0
混合物2	0. 6	0. 3	3 0
混合物3	0. 4	0. 2	2 0
混合物4	0. 2	0. 1	1 0
「混合物」5 (ビス(11-ヒドロキシウ ンデシル)ジスルフィドのみ)	0. 0	0. 0	0

各々の混合物中の成分の総濃度は、いずれの場合も、
エタノール溶液として 5×10^{-4} mol/lである。

スライドガラスをアルゴンの保護的雰囲気下で、当該
溶液と6時間インキュベートし、続いて、それをエタノ
ールのみですすぎ、アルゴン気流中で乾燥させる。吸着
したビオチン含有単分子層の厚さを、実施例4と同様に
定量する。

屈折率を1.45とすると、その結果、吸着された単分子
層の厚さは第2図に示すとおりである。「混合物」1、
すなわちビオチン化合物5のみからなる単分子層につい
て、260nmの厚さが得られる。これを、ビオチンを保持
するジスルフィド部分に関する約360nm、およびビオチ
ンを保持しない部分に関する約130nmの割合から得られ
た理論値250nmと比較すると、その表面は高密度の単分
子層で覆われている。スペーサー分子の半分だけがビオ
チンに結合しているため、ビオチンに関する被覆率は50
%である。

「混合物」5について、ビオチンを持たないジスルフ
ィドの高密度の被覆が得られる；混合物2-4では厚さ
の減少がみられるが、これはインキュベーション溶液中
の混合比率に対応してビオチン化合物5の部分が存在す
ることを当然意味する。

実施例24

ビオチンを有する実施例12の単分子層へのストレプトア

* 着させた高屈折率ガラスLA SF N 9製の顕微鏡スライド
ガラスを固体保持材として用いる。

ビオチン分子を担う非対称ジスルフィドビオチン化合
物5(実施例13)およびビオチン分子を持たない対称ビス
(11-ヒドロキシウンデシル)ジスルフィド(実施例
2の中間段階)を用いた。両化合物はいずれも、それぞ
れ2個のスペーサー($(CH_2)_{11}$)を有する。

ビジンの結合

実施例23で得られたビオチンを有する単分子層を実施
例5と同様にストレプトアビジンとともにインキュベ
ートする。ストレプトアビジンの結合によって起こる厚さ
の増加の飽和値を第2図に示す。ビオチンのモル分率0.
1-0.5で、非常に高いストレプトアビジンとの結合能力
が観察される。その結果、被覆率67-100%の高密度ス
トレプトアビジンフィルムが得られる。結合速度論は非
常に速く、1-2分の半分である。

実施例25

1- ϵ -ブチルオキシカルボニル-1,8-ジアミノ-ジ
オキサオクタン(モノ-BOC-DADDO)の合成

109g(0.5mol)ジ- ϵ -ブチルジカルボネートを450m
lジオキサンに溶解した溶液を142g(1モル)1,8-ジア
ミノ-3,6-ジオキサオクタン(DADDO)の900mlジオキ
サン/水(1/1 v/v)溶液にゆっくりと添加する。添加
後、混合物を20°Cでさらに1.5時間攪拌し、次に、溶媒
を溜去し、残留物を1Lの酢酸エチル/水(1/1 v/v)に
とる。水相を除いた後、有機相を各回100mlの0.1N HClで
2回抽出する。水相を集め、希水酸化ナトリウム溶液で
pHを9から10に調整し、その溶液を連続抽出器に於て液
-液抽出にかける。750ml酢酸エチルで8時間抽出した
後、溶媒を除去し、残留物を高真空で乾燥させる。

収量:32g(26%)

TLC:シリカゲル60

溶離液:酢酸ブチル/水/水酸化アンモニウム=30/15/5

RF=0.45

実施例26

1-(ビオチン-アミノカプロン酸)-(1,8-ジアミノ-4,6-ジオキサオクタン)-アミド、(ビオチン-X-DADOO)の合成

0.9g (2mmol/ℓ) D-ビオチニル-アミノカプロン酸-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Boehringer Mannheim, 製品番号1003933) および0.5g (2mmol/ℓ) モノ-BOC-DADOOを、10mlジオキサンおよび10mlの0.1mol/ℓリン酸カリウムバッファpH8.5に溶解した溶液を、20°Cで約2時間攪拌する。反応終了後(TLCでモニターする:シリカゲル60、溶離液:酢酸エチル/メタノール=3/7、RF=0.6)、溶媒を減圧濃縮によって除去し、残留物に1mlのトリフルオロ酢酸を加える。BOC基が完全に脱離するまで、約30分間攪拌する。次にトリフルオロ酢酸を減圧濃縮によって除去し、5ml酢酸エチルを残留物に加え、非溶解性物質を濾別し、濾液を蒸発乾固させる。

収量:0.96g (98%)

TLC:シリカゲル60、溶離液:酢酸エチル/メタノール=2:8、RF=0.2

実施例27

S-アセチル-メルカプトプロピオン酸の合成

8.6g (110mmol) 塩化アセチルを、20°Cで、10.6g (100mmol) メルカプトプロピオン酸にゆっくりと滴下して添加する。添加が完了した後、10分間100°Cに熱する。反応混合物を減圧蒸留にかけ、0.4バール、105°Cで、生成物が純粋な形で得られる。

収量:5.8g (36%)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 2.3 (s, 3H), 2.7 (t, 2H), 3.1 (t, 2H)

実施例28

N-スクシンイミジル-S-アセチルチオプロピオネート (SATP) の合成

16.2g (0.1mol) S-アセチル-メルカプトプロピオン酸、12.7g (0.11mol) N-ヒドロキシスクシンイミド、および22.7g (0.11mol) ジシクロヘキシルカルボジイミドを、0.4L無水酢酸エチル中で、20°Cで16時間、攪拌した。生じた沈澱を濾別し、濾液を減圧濃縮する。油状の残留物を少量の酢酸エチルにとり、冷却する。この段階でさらに沈澱が生じるが、これを捨てる。この段階を2回繰り返す。最後の濾液を濃縮した後、13g (50%) SATPが得られる。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ (ppm) = 2.3 (s, 3H), 2.8 (s, 4H), 2.9 (m, 2H), 3.1 (m, 2H)

実施例29

ビオチン-アミノカプロン酸-アミドジオキサオクチル

-メルカプトプロピオン酸-アミド (ビオチン化合物7) の合成

0.96g (2mmol) ビオチン-X-DADOO (実施例26より) および0.5g (2mmol) SATP (実施例28より) を20mlジオキサンおよび20ml 0.1mol/ℓリン酸カリウムバッファpH8.5に溶解した溶液を、20°Cで2時間攪拌する。次に、その溶液を蒸発乾固し、残留物を2mlトリフルオロ酢酸にとり、不活性ガス下、20°Cで0.5時間攪拌する。シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製を行う。

(溶離液:酢酸エチル/メタノール=3:7)

収量:150mg (13%)

TLC:シリカゲル60、酢酸エチル/メタノール=3/7、

RF=0.35

実施例30

ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル-S-アセチル-メルカプトプロピオン酸 (ビオチン-DADOO-SATP) の合成

1.4g (5.35mmol) SATP (実施例28より) の40mlジオキサン溶液を、1g (2.7mmol) ビオチン-DADOOを40ml 0.1mol/ℓリン酸カリウムバッファpH7.0に溶解した溶液に、ゆっくりと添加する。添加の間、0.1mol/ℓリン酸カリウムバッファを用いて、pHの値をたえず7.0に調整しなければならない。添加終了後、さらに10分間攪拌し、次に蒸発乾固する。粗生成物を、精製無しでの次の段階に用いることができる。

TLC:シリカゲル60、溶離液:酢酸エチル/メタノール=3.5/7.5、RF=0.35

実施例31

ビス-(ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)-メルカプトプロピオン酸-アミド-ジスルフィド (ビオチン化合物8) の合成

1.6gの実施例30の粗生成物を100mlの窒素飽和0.5mol/ℓリン酸カリウムバッファpH7.5に溶解し、5.4mlの1mol/ℓメタノール性ヒドロキシルアミン溶液と混合する。それを20°Cで2時間攪拌し、次に、減圧下で蒸発乾固し、シリカゲルでのフラッシュクロマトグラフィーによって精製する (酢酸エチル/メタノール=3/7)

収量:150mg (6%)

TLC:シリカゲル60、溶離液:酢酸エチル/メタノール=3/7

RF=0.35

実施例32

ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル-S-アセチルメルカプト酢酸-アミド (ビオチン-DADOO-SATA) の合成

合成は、187mg (0.8mmol) N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート (SATA) (Boehringer Mannheim, 製品番号1081765 (および300mg (0.8mmol) ビオチン-DADOOを原料として、実施例30と同様に行われ

る。

収量: 109mg (49%)

TLC: シリカゲル60、溶離液: 酢酸エチル/メタノール = 6.5/3.5、RF = 0.35

実施例33

ビスー(ビオチンアミド-3,6-ジオキサオクチル)-メルカプト酢酸-アミド-ジスルフィド(ビオチン化合*

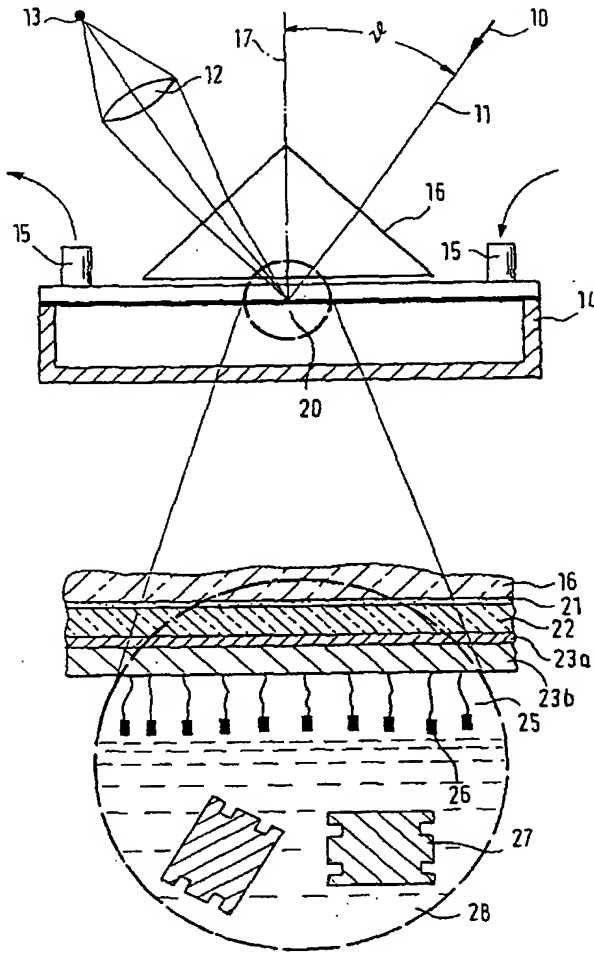
*物9)の合成

合成は、100mg (0.2mmol) ビオチン-DADCO-SATAおよび0.25ml 1mol/l メタノール性ヒドロキシラミン溶液を原料として、実施例31と同様に行われる。

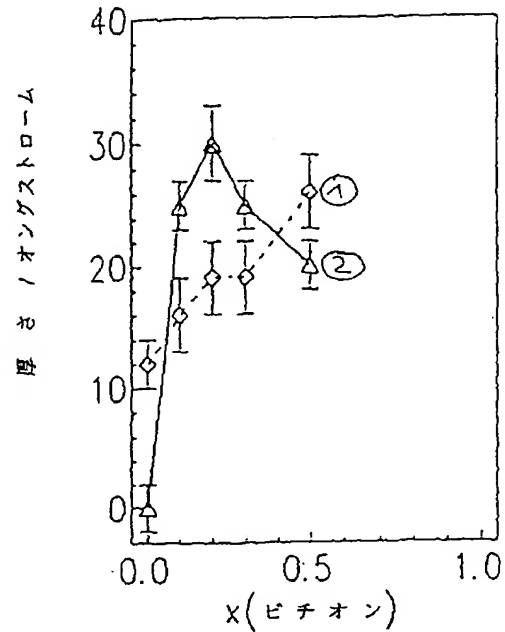
収量: 55mg (60%)

TLC: シリカゲル60、溶離液: 酢酸エチル/メタノール = 3/7、RF = 0.35

【第1図】

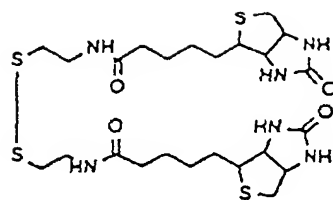


【第2図】

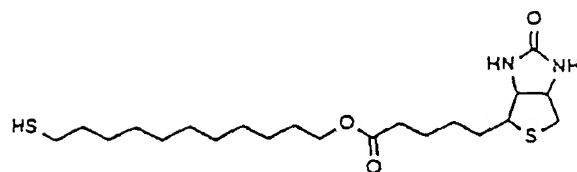


【第3a図】

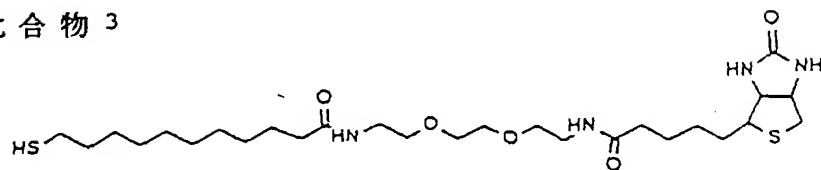
ビチオン化合物 1



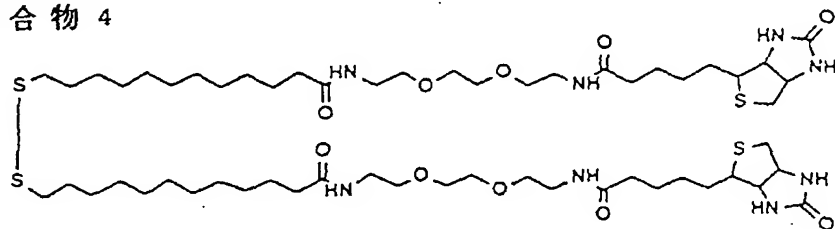
ビチオン化合物 2



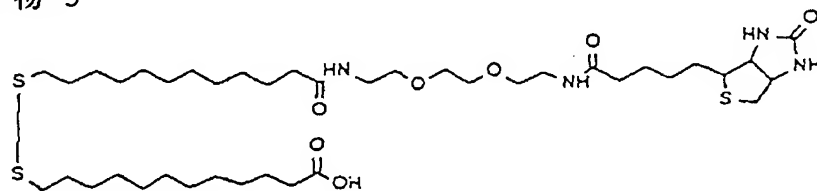
ビチオン化合物 3



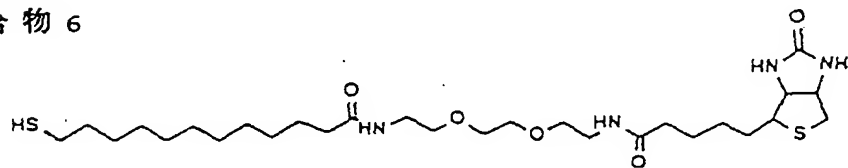
ビチオン化合物 4



ビチオン化合物 5

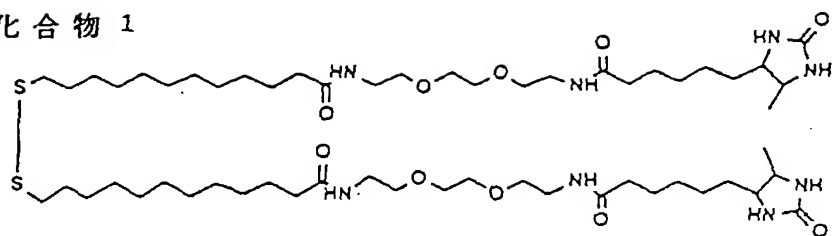


ビチオン化合物 6

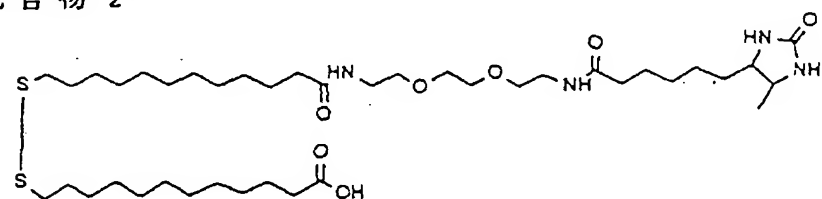


【第3b図】

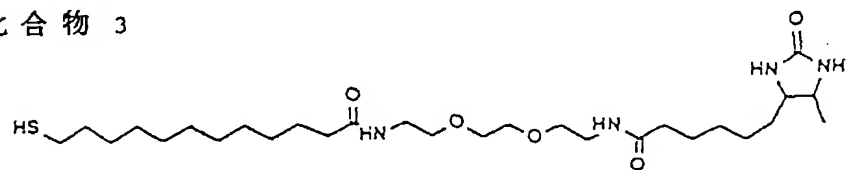
デスチオ化合物 1



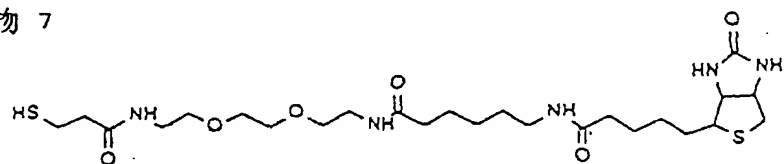
デスチオ化合物 2



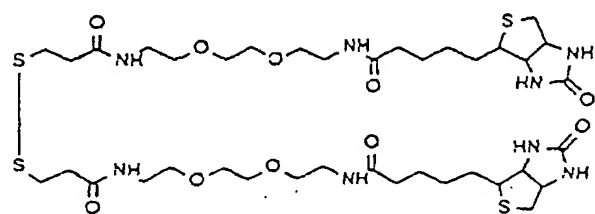
デスチオ化合物 3



ビチオン化合物 7

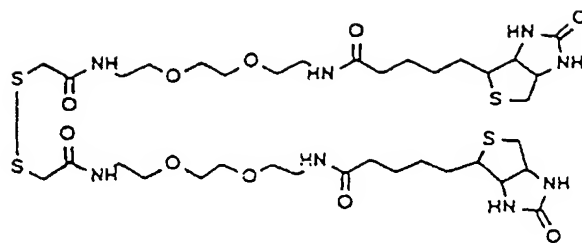


ビチオン化合物 8

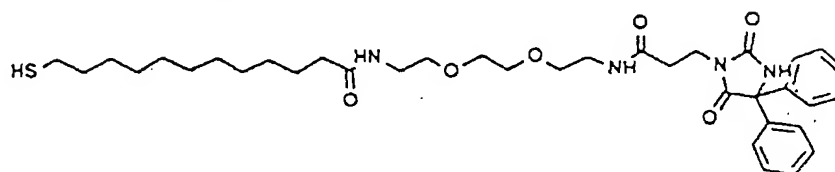


【第3c図】

ビチオン化合物 9



ジフェニルヒダントイン化合物



フロントページの続き

(72)発明者 シュミット, フランツ・ヨセフ
 ドイツ連邦共和国 D-5501 ライヴェ
 ン, マットティアスシュトラッセ 19

(72)発明者 クライン, クリスチャン
 ドイツ連邦共和国 D-8120 ヴァイル
 ハイム, ブリューステンシュトラッセ 16

(56)参考文献 特開 昭63-100355 (J P, A)
 特開 平2-161346 (J P, A)